

氏 名（本籍）	中 西 聡（香川県）
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	乙第 434 号
学位授与年月日	平成 29 年 12 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 3 項該当
学位論文題名	Slc:Wistar クローズドコロニーラットおよび Zucker fatty 由来クローズドコロニーラットの遺伝的プロファイル解析に関する研究
論文審査委員	（主査） 阪 口 雅 弘 （副査） 猪 股 智 夫 村 上 賢

## 論 文 内 容 の 要 旨

実験動物としてのラットは、ドブネズミ（学名 *Rattus norvegicus*，英名 Norway rat）を馴化したものであり、同じクマネズミ属に含まれるクマネズミ（学名 *Rattus rattus*，英名 black rat）とは異なる。ラットは、栄養、代謝、および生理学上の特徴がヒトと類似している点が多いことから、医学、薬理学、毒性学、生物学、栄養学、行動、心理学、免疫学、あるいは腫瘍学などの幅広い分野での実験動物および医薬品等の毒性試験や安全性試験に広く使用されている。遺伝的統御の違いから、近交系（Inbred strains）とクローズドコロニー（Outbred rats とも言う）に大別される。近交系とは兄妹交配を 20 代以上継続し、ほぼすべての遺伝子座がホモ型に固定した遺伝的に均一な動物である。現在、近交系ラットは世界中で 300 系統以上が樹立されている。一方、クローズドコロニーは、5 年以上にわたって他の群からの遺伝子の移入がなく、一定の集団のみで繁殖を継続するので、一般的に、個体ごとに遺伝子組成が異なる。

実験用ラットは、これまでに選抜育種、他系統との交雑や遺伝子改変技術の進歩によって、研究目的に応じて様々なラット系統が開発されてきた。研究目的にあった遺伝的特徴を持ったラットを研究に用いることが求められるので、ジェノタイピングにより遺伝的プロファイル解析を行い、その遺伝的な特性を明らかにすることが重要である。そのためには、正確、迅速、簡便で効率的なジェノタイピング法の確立や遺伝多型マーカーを用いた遺伝的モニタリングシステムの構築は必須である。本研究の目的は、遺伝的プロファイル解析に有用な遺伝多型マーカーを用いて Slc:Wistar クローズドコロニーラットおよび Zucker fatty 由来クローズドコロニーラットの遺伝的特徴を明らかにすることであり、さらに、遺伝的品質管理に適した迅速で簡便なジェノタイピング法についての技術開発を行うことである。

第1章では、第3世代の遺伝多型マーカーである SSLP マーカーをクローズドコロニーラットの遺伝的プロファイル解析に適応し、その有用性を検討した。クローズドコロニーラットである Slc:Wistar ラットの様々な表現形質が、F344 近交系ラットと類似している問題について、ゲノム全域に散在する 27 個の SSLP マーカーを選定して Slc:Wistar ラットと F344 ラットの遺伝的プロファイル解析を行った。本章で選定した 27 個の SSLP マーカーは近交系ラットのみならず、クローズドコロニーラットの遺伝的プロファイル解析に有効であることが示された。Slc:Wistar ラットは、85%の遺伝子座が特定の対立遺伝子に固定しており、遺伝的多様性が低いことが示された。そして、それらの遺伝子型は F344 ラットの遺伝子型と同一であった。以上の結果から、Slc:Wistar ラットは遺伝的多様性が著しく低く、Slc:Wistar ラットと F344 近交系ラットの遺伝的プロファイルには類似性が高いことが明らかになった。

第2章では、東京医科大学で維持されていた ZF ラットコロニーを由来とする肥満を示す Slc:ZF ラットコロニーと肥満、糖尿病を示す Hos:ZFDM ラットコロニーの表現型の相違を調べるため遺伝的プロファイル解析を行った。はじめに Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットの遺伝的プロファイルを作成するために、第1章で選定した 27 個の SSLP マーカーを用いてゲノム DNA 抽出を必要としない迅速で簡易なジェノタイピングシステムにて遺伝的プロファイルを作成した。次に、これら 2 つのラットコロニーの遺伝的特徴を明らかにするために、東京医科大学で維持されていた ZF ラットコロニーを由来とする KZF ラット系統と KZC ラット系統の遺伝的プロファイルと比較した。最後に、染色体上の分散状態を考慮して Y 染色体を除く全ての常染色体と X 染色体上に各 3~4 個の SSLP マーカーを選択し、合計 72 個の SSLP マーカーを加えてより詳細な遺伝的プロファイル解析を行った。Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットの 2 つのクローズドコロニーラットは、共に約 90%の遺伝子座が特定の対立遺伝子に固定していた。また、両コロニーは同じコロニーを起源とするにもかかわらず異なる対立遺伝子を有する遺伝子座が約 30%であり、これが、2 つのクローズドコロニーラットの表現型の相違の基盤となっていると考えられた。本研究で行った、Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットの遺伝的プロファイル解析は、2 型糖尿病の発症と繁殖性に関連する遺伝的要因を明らかにするのに貢献できると結論づけられた。

第3章では、第1章と第2章で実施した遺伝的プロファイル解析など生体サンプルの遺伝子型判定を迅速かつ簡便に行う方法の開発とその応用について検討を行った。本章では、PCR 阻害物質を中和する PCR 緩衝液 Ampdirect Plus と flinders technology associates (FTA) カードを組み合わせたゲノム DNA 抽出を必要としない迅速で簡易なジェノタイピング法である Ampirect Plus-FTA (Amp-FTA) 法の開発を試みた。また、外来性遺伝子の検出、第3世代の遺伝多型マーカーである SSLP マーカーと第4世代の遺伝多型マーカーである SNPs を用いて内在性遺伝子の検出について検討を行った。さらに、試料の採材方法や室温にて長期保存した場合の PCR に及ぼす影響についても検討を行った。Amp-FTA 法では、FTA カードに採取したごく少量の血液を未精製のままディスクとして打ち抜き PCR テンプレートとして使って PCR 増幅を行うことが可能である。PCR 産物は、直接制

限酵素、PCR ダイレクトシーケンスおよび定量 PCR に応用することができた。さらに、FTA カードに採取した血液を 10 年間室温で保存しても再現性の高いジェノタイピングが可能である。また、マウスやラットにおいて非侵襲的な口腔スワブ由来のサンプルにおいても PCR 増幅が可能である。Amp-FTA 法によるジェノタイピングは、正確、迅速、簡易、高い再現性に加えて、微生物汚染の軽減、作業の安全性向上にも繋がり、ラットの遺伝的な品質管理において優れている。さらに、Amp-FTA 法によるジェノタイピングは、医学、獣医学、農学（食品、畜産、畜産、園芸等）など、PCR によるジェノタイピングを行う領域すべてにおいて応用可能であると考えられる。

本研究では、遺伝的プロファイル解析に有用な遺伝多型マーカーを用いて Slc:Wistar クローズドコロニーおよび Zucker fatty 由来クローズドコロニーラットの遺伝的特徴を明らかにし、さらに、遺伝的プロファイル解析など生体サンプルの遺伝子型判定を迅速かつ簡便に行う方法の開発とその応用について具体的な研究成果を示した。研究目的にあった遺伝的特徴を持ったラットを研究に用いることの重要性を示し、今後、さらに実験動物としてのラットを用いた研究の発展に寄与するものであると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

実験動物としてのラットは、栄養、代謝、および生理学上の特徴がヒトと類似している点が多いことから、実験動物および医薬品等の毒性試験や安全性試験に広く使用されている。遺伝的背景の違いから、近交系とクローズドコロニーに大別される。近交系とは兄妹交配を 20 代以上継続し、ほぼすべての遺伝子座がホモ型に固定した遺伝的に均一な動物である。現在、近交系ラットは世界中で 300 系統以上が樹立されている。一方、クローズドコロニーは、5 年以上にわたって他の群からの遺伝子の移入がなく、一定の集団のみで繁殖を継続するので、一般的に、個体ごとに遺伝子組成が異なる。このクローズドコロニーの遺伝的多様性は、各コロニーの遺伝子頻度の違いによって具体的に比較することができる。

実験用ラットは、これまでに選抜育種、他系統との交雑や遺伝子改変技術の進歩によって、研究目的に応じて様々な近交系およびクローズドコロニーラット系統が開発されてきた。京都大学実験動物施設ではナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」事業を行っており、ライフサイエンス研究におけるラットについて収集・保存・提供を行っている。ライフサイエンス研究では遺伝的特徴を持ったラットを用いることが求められるので、ジェノタイピングにより遺伝的プロファイル解析を行い、その遺伝的な特性を明らかにすることが重要である。その為には、正確、迅速、簡便で効率的なジェノタイピング法の確立や遺伝多型マーカーを用いた遺伝的モニタリングシステムの構築は必須である。本研究の目的は、クローズドコロニーラットを含めたラットにおける遺伝的プロファイル解析

に有用な遺伝多型マーカーを用いてラットの遺伝的特徴を明らかにすることであり、さらに、遺伝的品質管理に適した迅速で簡便なジェノタイピング法についての技術開発を行うことである。

第1章では、遺伝多型マーカーである Simple sequence length polymorphism (SSLP) マーカーを用いてクローズドコロニーラットである 5 種類の Wistar ラットの遺伝的プロファイル解析を行い、その有用性を検討した。クローズドコロニーラットである Slc:Wistar ラットの様々な表現形質が、F344 近交系ラットと類似していることが報告されてきた。ゲノム全域に散在する 27 個の SSLP マーカーを選定して Slc:Wistar ラットと F344 ラットの遺伝的プロファイル解析を行った。Slc:Wistar ラットは、85%の遺伝子座が特定の対立遺伝子に固定しており、他の Wistar クローズドコロニーラットと比較して遺伝的多様性が低いことが示された。そして、それらの遺伝子型は F344 ラットの遺伝子型と同一であった。以上の結果から、Slc:Wistar ラットは他の Wistar ラットと比べて遺伝的多様性が著しく低く、Slc:Wistar ラットと F344 近交系ラットの遺伝的プロファイルには類似性が高いことが明らかになった。本章で選定した 27 個の SSLP マーカーは近交系ラットのみならず、クローズドコロニーラットの遺伝的プロファイル解析に有効であることが示された。

第2章では、東京医科大学で維持されていた ZF ラットコロニーを由来とする肥満を示す Slc:ZF クローズドコロニーラットと肥満と糖尿病を合わせて示す Hos:ZFDM クローズドコロニーラットの表現型の相違を探るため遺伝プロファイル解析を行った。はじめに Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットの遺伝的プロファイルを作成するために、第1章で選定した 27 個の SSLP マーカーを用いて遺伝的プロファイルを作成した。さらに、染色体上の分散状態を考慮して Y 染色体を除く全ての常染色体と X 染色体上に各 3~4 個の SSLP マーカーを選択し、合計 72 個の SSLP マーカーを加えてより詳細な遺伝的プロファイル解析を行った。Slc:ZF ラットと Hos:ZFDM ラットの 2 つのクローズドコロニーラットは、両コロニーは同じコロニーを起源とするにもかかわらず異なる対立遺伝子を有する遺伝子座が約 30%あり、これが、2 つのクローズドコロニーラットの表現型の相違の基盤となっていると考えられた。本研究で行った Slc:ZF ラットと糖尿病を発症する Hos:ZFDM ラットの遺伝的プロファイル解析は、2 型糖尿病の発症の遺伝的要因を明らかにするのに貢献できると考えられた。

第3章では、遺伝的プロファイル解析など生体サンプルの遺伝子型判定を迅速かつ簡便に行う方法の開発とその応用について検討を行った。本章では、PCR 阻害物質を中和する PCR 緩衝液 Ampdirect Plus と flinders technology associates (FTA) カードを組み合わせたゲノム DNA 抽出を必要としない迅速で簡易なジェノタイピング法である Ampirect Plus-FTA (Amp-FTA) 法の開発を試みた。また、第1章で行った遺伝多型マーカーである SSLP マーカーと第4世代の遺伝多型マーカーである SNPs を用いて内在性遺伝子の検出について検討を行った。さらに、試料の採材方法や室温にて長期保存した場合の PCR に及ぼす影響についても検討を行った。Amp-FTA 法では、FTA カードに採取したごく少量の血液を未精製のままディスクとして打ち抜き PCR テンプレートとして使って PCR 増幅を行うことが可能であった。さらに、FTA カードに採取した血液を 10 年間室温で保存しても再現性の高いジェノタイピングが可能である。また、マウスやラットにおいて非侵襲的な口腔スワブ由来のサン

ルにおいても PCR 増幅が可能である。Amp-FTA 法によるジェノタイピングは、正確、迅速、簡易、高い再現性を持ち、ラットおよびマウスの遺伝的な品質管理において優れていることが分かった。

本研究により、遺伝的プロファイル解析に有用な遺伝多型マーカーを用いて **Slc:Wistar** クローズドコロニーおよび **Zucker fatty** 由来クローズドコロニーラットの遺伝的特徴を明らかにし、さらに、遺伝的プロファイル解析など生体サンプルの遺伝子型判定を迅速かつ簡便に行う方法の開発とその応用について具体的な研究成果を示した。本研究は新しい知見を提供し、獣医学に貢献したと考えられる。このことから本研究は博士（獣医学）の学位を授与するにふさわしい業績と判断した。